

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Juni 2004 (17.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/051275 A1(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/543,
C12Q 1/68(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SIEMENS AKTIENGESellschaft [DE/DE];
Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/003938

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. November 2003 (28.11.2003)

(72) Erfinder; und

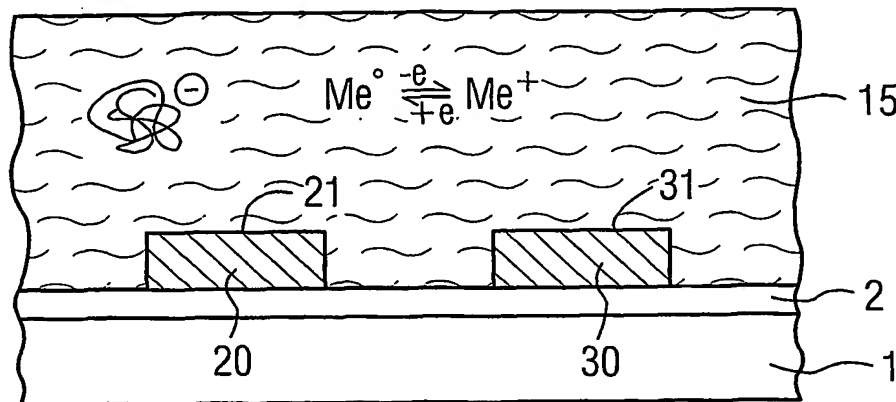
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BARLAG, Heike
[DE/DE]; Äussere Laufer Gasse 10, 90403 Nürnberg
(DE). GUMBRECHT, Walter [DE/DE]; In der Röte
1, 91074 Herzogenaurach (DE). STANZEL, Manfred
[DE/DE]; Taunusstrasse 100, 91056 Erlangen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 56 415.9 2. Dezember 2002 (02.12.2002) DE(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS AKTIENGE-
SELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506 München
(DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR TRANSPORTING OR BINDING-SPECIFIC SEPARATION OF ELECTRICALLY
CHARGED MOLECULES(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUM TRANSPORT BZW. ZUR BINDUNGSPEZIFISCHEN TREN-
NUNG ELEKTRISCH GELADENER MOLEKÜLE

(57) **Abstract:** Electrically charged molecules need to be transported in order to create a DNA sensor. According to the invention, the following measures are undertaken: base metals are introduced into a solution as a positive ion; negatively charged molecules are transported in an opposite direction and are enriched in the vicinity of the measuring electrodes. Binding-specific separation of the charged molecules can be achieved by forming metal layers on the measuring electrodes by depositing metal ions from the solution when a suitable potential is selected. Target DNA can more particularly be introduced into the vicinity of catcher molecules on the measuring electrodes and non-specifically bound DNA can be removed. According to the associated device, the electrode arrangement (20,30) is associated with a sacrificial electrode (40) made of a more base metal than the material of the measuring electrodes (20,30). The measuring electrodes (20,30) in particular are made of noble metal, preferably gold, and the sacrificial electrode (40) is made of copper.

(57) **Zusammenfassung:** Zur Schaffung eines DNA-Sensors müssen elektrisch geladene Moleküle transportiert werden. Gemäss der Erfindung erfolgen folgende Massnahmen: Es werden unedle Metalle als positives Ion in Lösung gebracht, wodurch negativ geladene Moleküle in die entgegengesetzte Richtung transportiert und in der Nähe der Messelektroden angereichert werden. Durch Ausbildung von Metallschichten auf

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,

NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

den Messelektroden durch Anlagern der Metallionen aus der Lösung lässt sich bei Vorgabe eines geeigneten Potentials eine bindungsspezifische Trennung der geladenen Moleküle erreichen. Insbesondere können somit Ziel-DNA in die Nähe von Fänger-Molekülen an den Messelektroden gebracht und auch unspezifisch gebundene DNA entfernt werden. Bei der zugehörigen Vorrichtung ist der Elektrodenanordnung (20, 30) eine Opferanode (40) aus unedlerem Metall als das Material der Messelektroden (20, 30) zugeordnet. Die Messelektroden (20, 30) bestehen insbesondere aus Edelmetall, vorzugsweise Gold, und die Opferanode (40) aus Kupfer.

Beschreibung

Verfahren und Vorrichtung zum Transport bzw. zur bindungsspezifischen Trennung elektrisch geladener Moleküle

5

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Transport bzw. zur bindungsspezifischen Trennung elektrisch geladener Moleküle in einer wässrigen Lösung, insbesondere beim Betrieb eines DNA-Sensors mit einem Redox-Cycling-Prozess zwischen
10 zwei Messelektroden. Daneben bezieht sich die Erfindung auf die zugehörigen Vorrichtungen.

Bei zahlreichen Verfahren der Molekularbiologie spielt der

15 Transport von geladenen Teilchen im elektrischen Feld (Migration) eine wichtige Rolle. Die Wanderungsgeschwindigkeit v der geladenen Teilchen im flüssigen Medium ist dabei proportional der Feldstärke E und der Ionenladung Q und umgekehrt proportional dem Teilchenradius r und der Viskosität η der
20 Suspension. Es ergibt sich für die Geschwindigkeit v :

$$v = QE/6\pi r\eta \quad (1)$$

Bei der Elektrophorese z.B. werden Biomoleküle, d.h. vor allem Proteine und DNA, die sich bezüglich ihrer Größe und/
25 oder Ladung unterscheiden, voneinander getrennt. Die Anwesenheit von anderen beweglichen, geladenen Teilchen ist bei bestimmten Formen der elektrophoretischen Trennung (z.B. isoelektrische Fokussierung) zu vermeiden, da sonst der Ladungstransport teilweise oder ganz von diesen und nicht von den zu
30 trennenden Molekülen übernommen wird. Als Puffer werden daher oft Aminosäuren verwendet, die ihren isoelektrischen Punkt beim gewünschten pH-Wert haben. Das heißt, beim eingestellten pH-Wert haben die Puffermoleküle selbst keine Nettoladung und unterliegen daher nicht der Migration.

35

Auch beim Transport von geladenen Molekülen, z.B. um die Konzentration an einem bestimmten Ort zu erhöhen oder zu erniedrigen, werden elektrische Felder eingesetzt. Insbesondere bei Mikrosensoren, z.B. zur DNA-Analyse, kann die Empfindlichkeit gesteigert werden, wenn die zu detektierenden DNA-Fragmente (Zielmoleküle) am Ort der Fängermoleküle (Sensoroberfläche) konzentriert werden. Gemäß dem Massenwirkungsgesetz steigt damit die Zahl der Fänger-/Zielmolekülbindungen. In jedem Fall werden bei einer solchen Reaktion aber nicht nur Fänger-/Zielmolekülpaaire gebildet, die exakt zueinander passen, sondern auch solche, deren Sequenz an einigen Stellen nicht exakt miteinander korrespondieren (Mismatches).

Da die Größe der Bindungsenergie mit der Zahl der nicht korrespondierenden Basen abnimmt, können durch die Anwendung entsprechender Kräfte selektiv solche Bindungen wieder getrennt werden, die eine bestimmte Zahl von Mismatches besitzen (Stringenzbehandlung). Als Kraft kann hier ein elektrisches Feld wirksam werden, das im Gegensatz zum ersten Prozess, dem Konzentrieren der Moleküle, eine entgegengesetzte Polarität aufweist.

Vorraussetzung für den Transport von geladenen Teilchen im elektrischen Feld ist ein Feldgradient, der innerhalb des Elektrolyten bzw. der Transportstrecke, streng monoton verläuft. Das heißt, der Feldgradient darf sein Vorzeichen nicht ändern und nicht zu Null werden. Das Anlegen einer beliebigen Spannung ist dazu für wässrige Systeme nicht zwangsläufig ausreichend. In Abwesenheit einer chemischen Reaktion vor den Elektroden fällt die Spannung über die elektrochemische Doppelschicht ab und der Feldgradient zwischen den Elektroden wird zu Null. Wenn allerdings eine Reduktions- bzw. Oxidationsreaktion an den Elektroden stattfindet, wird die Doppelschicht vor den Elektroden depolarisiert und das elektrische Feld verläuft streng monoton innerhalb des Elektrolyten. Ein Ionentransport im wässrigen Elektrolyten ist die Folge.

Ein häufig angewendetes Verfahren zur Erzeugung solcher elektrischer Felder in wässrigen Systemen ist das Anlegen der Zersetzungsspannung von Wasser. Dabei wird an der Anode Sauerstoff und an der Kathode Wasserstoff entwickelt. Bei der experimentelle Durchführung muss darauf geachtet werden, dass die Gase und insbesondere ihre radikalischen Vorstufen nicht mit den zu untersuchenden Molekülen in Kontakt kommen, da diese sonst chemisch verändert würden. In makroskopischen Systemen geschieht dies durch Trennung der Elektrolyträume direkt vor den Elektroden vom Elektrolytraum zwischen den Elektroden, z.B. durch Diaphragmen. Für Mikrosensoren ist diese Lösung problematisch, da Diaphragmen nicht praktikabel sind.

Eine Möglichkeit zur Elektrophorese in Mikrosystemen besteht darin, dass sogenannte Permeationslayer aus hydrophilem Polymer vor den Elektroden eingeführt werden, wozu auf die US 5 605 662 A verwiesen wird. Die Beweglichkeit von Reaktionsprodukten der Wasserelektrolyse und der zu transportierenden DNA ist in dieser Schicht stark gehemmt, so dass eine Durchmischung quasi nicht stattfindet. Der Ladungstransport im Permeationslayer wird von kleineren Ionen übernommen.

Obwohl das bekannte Verfahren praktikabel ist, wird durch die Einführung neuer Polymer-Schichten die Herstellung des Mikrosensorschips deutlich aufwändiger und damit teurer.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein geeignetes Verfahren zum Transport der geladenen Moleküle mittels eines elektrischen Feldes anzugeben, bei denen an der Elektrode keine Wasserstoff- bzw. Sauerstoffentwicklung eintritt. Insbesondere soll unter Ausnutzung des Elektrophoreseverfahrens eine entsprechende Vorrichtung geschaffen werden, welche mit Standard-Materialien und Schichten der Chipherstellung auskommen.

Die Aufgabe ist bezüglich des Verfahrens durch die Merkmale alternativ des Patentanspruches 1 oder des Patentanspruches

12 gelöst. Eine zugehörige Vorrichtung ist im Patentanspruch
15 angegeben. Weiterbildungen des Verfahrens bzw. der Vor-
richtung sind Gegenstand der jeweils abhängigen Ansprüche.

- 5 Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung können mit einem prin-
zipiell gleichen Aufbau fakultativ das erfindungsgemäße Ver-
fahren gemäß Patentanspruch 1 oder das erfindungsgemäße Ver-
fahren gemäß Patentanspruch 12 ausgeführt werden. Dabei ist
es auch vorteilhafterweise möglich, beide Verfahren miteinan-
10 der zu kombinieren, beispielsweise zyklisch.

Die Erfindung macht sich bei der Anwendung des Elektrophore-
severfahrens zunutze, dass zur Erzeugung des elektrischen
Feldes in der Analytlösung außer der Elektrolyse von Wasser
15 auch andere Reaktionen eingesetzt werden können. Gemäß der
Erfindung wird ein Metall/Metallionkomplex, z.B. Kupfer/
Kupferhistidinkomplex, als Depolarisator vor den Elektroden
vorgeschlagen. Bei positiver Polarisierung einer mit Kupfer
beschichteten Elektrode zwecks Aufkonzentrierung negativ ge-
20 ladener Ionen wird dann nicht Sauerstoff entwickelt, statt
dessen geht das Kupfer als Ion in Lösung. Ist dort ein Kom-
plexbildner für das Metall, z.B. Histidin für Kupfer, vorhan-
den, so bleibt das Metallion stabil in Lösung. Da z.B. der
Kupfer-Histidin-Komplex sehr stabil ist, bleibt die Konzentra-
25 tion der freien Kupferionen sehr klein und nahezu konstant.
Ein Einfluss der Kupferionen auf die DNA-Hybridisierung wird
dadurch vermieden.

Soll die Elektrode negativ polarisiert werden, um z.B. die
30 Selektivität der Fänger-/Zielmolekülbindung zu erhöhen
(Stringenzbehandlung), d.h. unspezifisch gebundene, nicht-
komplementäre Proben-DNA von der Fänger-DNA zu entfernen,
werden bei Anwesenheit eines Metallionenkomplexes eines hin-
reichend edlen Metalls, z.B. Kupfer, die Metallionen redu-
35 ziert und dabei auf den Elektroden (in diesem Fall den Mess-
Elektroden) abgeschieden. Eine Wasserstoffentwicklung wird
dadurch vermieden. Der Komplexbildner für das Metallion kann

u.U. auch gleichzeitig als Puffer dienen. Histidin wird beispielsweise als Puffer bei pH = 7 eingesetzt. Das auf den Mess-Elektroden abgeschiedene Kupfer kann in einem Waschschr
5 Schritt durch erneutes Anlegen von negativem Potenzial entfernt werden. Ein Abstoßen der Zielmoleküle wird dadurch verhindert, dass eine Waschlösung mit hoher Ionenstärke eingesetzt wird, so dass nur z.B. Kupfer in Form von Cu^{2+} -Ionen entfernt wird, die Ziel-DNA jedoch nicht bewegt wird.

10 Der Vorteil eines auf Metall/Metallionkomplex basierenden Elektrophoreseverfahrens liegt in der geringeren Spannung, die zur Erzeugung des elektrischen Feldes notwendig ist. Sie ist niedriger als die Elektrolysespannung von Wasser, so dass die aggressiven Produkte der Wasserelektrolyse nicht entstehen können. Damit wird eine Trennung von Elektrolyse- und
15 Elektrophoreseraum unnötig. Trotzdem reicht das erzeugte Feld aus, um die gewünschten Moleküle im Analyten zu transportieren.

20 Kupfer wird bereits heute für Leiterbahnen verwendet und kann künftig als Elektrodenmaterial für Sensoranwendungen bzw. mikrosystemtechnische Anwendungen wie Mikro-Elektrophorese eingesetzt werden. Bei der Herstellung eines solchen Mikrosystems kann daher auf kostengünstige Standardverfahren der
25 Halbleitertechnik zurückgegriffen werden.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden Figurenbeschreibung von Ausführungsbeispielen anhand der Zeichnung in Verbindung mit den Patentansprüchen. Es zeigen
30

Figur 1 einen prinzipiellen Aufbau zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens,
Figuren 2 bis 4 Querschnitte unterschiedlich ausgebildeter Anordnungen,
35

Figur 5a und 5b bei Anordnungen gemäß Figur 3 verfahrensmäßig das Anreichern von Zielmolekülen von geringer zu hoher Konzentration,
Figur 6a und 6b verfahrensmäßig eine Situation gemäß Figur 5b, bei der jedoch auch unspezifische, d.h. nicht-komplementäre Proben-DNA vorliegen, die einer sogenannten Stringenz-Behandlung unterliegen,
Figur 7 den Elektroden-Prozess bei der erfindungsgemäßen Verwendung einer Opferelektrode, sowie eines Komplexbildners,
Figuren 8 bis 10 Draufsichten auf unterschiedliche Messelektroden-Konfigurationen
Figur 11 eine Messanordnung mit nebeneinander angeordneten Messpositionen im Querschnitt und
Figur 12 eine aus Einzelpositionen entsprechend der Figur 8 gebildete Arrayanordnung in der Draufsicht.

Die Figuren werden teilweise gemeinsam beschrieben.

Aus Figur 1 ist der prinzipielle Aufbau einer allgemeinen Anordnung zur Durchführung von biochemischen Messungen ersichtlich. Mit 1 ist ein planares Substrat, z.B. aus Silicium, bezeichnet, auf dem eine dünne Isolatorschicht 2, z.B. aus Siliciumoxid (SiO_2) aufgebracht ist. Auf dieser Anordnung befinden sich zwei Messelektroden 20 und 30, die vorzugsweise aus Edelmetall, insbesondere Gold, bestehen. Die gesamte Messanordnung befindet sich in Kontakt mit einer wässrigen Lösung 15.

In der wässrigen Lösung 15 befinden sich negativ geladene Makro-Moleküle, was in Figur 1 durch die Knäuel-Struktur verdeutlicht wird, und die weiter unten in Figur 5 im Einzelnen mit 200, 200' beziffert sind. Die negativ geladenen Moleküle sollen zu den Messelektroden 20, 30 transportiert werden und werden nachfolgend auch als Zielmoleküle bezeichnet. Im Falle

einer DNA-Analyse sind die Zielmoleküle die zu untersuchende DNA. Über Fängermoleküle, die z.B. in einer Hydrogelschicht 35 immobilisierbar sind, kann die Ziel-DNA zwecks Messung in der Nähe der Elektroden 20, 30 angelagert werden.

5

In der wässrigen Lösung 15 ist weiterhin ein Material vorhanden, das in der wässrigen Lösung beständig und unedler als das Metall der Messelektroden ist. Im allgemeinsten Fall ist das Material eine Metall/Metallion(Me/Me^+)-Kombination, beispielsweise Cu/Cu^{2+} . Dies bedeutet, dass entsprechend den vorgegebenen Potenzialverhältnissen entweder metallisches Kupfer Cu^0 unter Abgabe von zwei Elektronen aufgelöst wird oder Kupfer(II)-Ionen Cu^{2+} unter Aufnahme von zwei Elektronen abgeschieden werden können, wobei gilt:

15



20

Bei der Anordnung gemäß Figur 5 kann bei einer Kupferelektrode als Opfer-Anode 40 durch Anlegen eines positiven Potentials Cu^{2+} in Lösung gehen. Dadurch werden dort die negativen Zielmoleküle 200 zur Kupferelektrode 40 bewegt und reichern sich in deren Nähe und damit auch im Bereich der Messelektroden 20, 30 an.

25

Sofern bei Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen in der wässrigen Lösung an die Messelektroden 20,30 gemäß Figur 6 ein geeignetes negatives Potenzial angelegt wird, lösen sich diejenigen Fängermolekül/Ziel-DNA-Bindungen, die aufgrund nicht vollständiger Komplementarität eine verminderte Bindungsstärke aufweisen.

30

Dabei werden gleichzeitig Kupfer(II)-Ionen (Cu^{2+}) an den Messelektroden zu metallischem Kupfer (Cu^0) reduziert.

35

Anhand der Figuren 5a, 5b einerseits und 6a, 6b andererseits sowie Figur 7 werden die methodischen Prozesse gemäß den in Figur 1 nur prinzipiell aufgezeigten Alternativen verdeutlicht. Speziell in den Figuren 5a bis 6b ist über den Messelektroden 20 und 30, welche Sensoroberflächen 21 und 31 ha-

ben, jeweils eine Hydrogelschicht 35 aufgebracht, in welcher Fängermoleküle 100 für Zielmoleküle 200, die sich außerhalb der Hydrogelschicht 35 befinden, eingeschlossen sind. Wesentlich ist dabei, dass die Fängermoleküle 100 die Zielmoleküle 200 einfangen bzw. binden und damit der Analyse an der Sensorfläche 21 bzw. 31 zuführen. Zu dieser Methodik wird beispielsweise auf die ältere Anmeldung PCT/DE 02/01982 der Anmelderin verwiesen.

10 Die Fänger-Moleküle 100 können beispielsweise spezielle thiolmodifizierte Oligonukleotide sein. Ziel-Moleküle 200, die von den Fänger-Molekülen 100 gebunden werden sollen, sind die zu analysierenden DNA's.

15 Im Allgemeinen liegt bei einer bekannten Messanordnung ein Zustand gemäß Figur 5a vor, bei dem die Ziel-DNA nur in geringer Konzentration über der Fänger-DNA vorliegt. Hier ist es schwierig, zu sicheren Messergebnissen zu kommen. Bei einer Anordnung gemäß Figur 5b liegt dagegen die Ziel-DNA in
20 hoher Konzentration über der Fänger-DNA vor, was durch eine DNA-Anreicherung erreicht wird. In diesem Zustand können gute Messergebnisse erzielt werden.

An der Fänger-DNA binden entsprechend der Figur 6a außer der
25 komplementären Ziel-DNA 200 auch nicht vollständig komplementäre DNA-Fragmente 200'. Durch eine Stringenz-Behandlung lässt sich unspezifisch gebundene DNA durch Beaufschlagen der Elektroden mit jeweils geeigneten Potentialen selektiv entfernen. Die unspezifisch gebundene DNA wird dann aufgrund ihrer
30 schwächeren Bindungskräfte abgestoßen.

Aus der Figur 1 sowie den Teilfiguren 5a und 5b ist ersichtlich, dass durch Anlegen spezifischer Potenziale an die Hilfselektrode 40 eine gewünschte Anreicherung der Ziel-DNA
35 erreicht wird. Im Einzelnen wird dazu eine Hilfselektrode 40 aus unedlem Metall, beispielsweise Kupfer, gewählt und an die Hilfselektrode 40 ein positives Potential angelegt. Sofern

sich die gesamte Anordnung in einer wässrigen Lösung befindet, gehen Cu^{2+} -Ionen in Lösung. Dadurch entsteht ein Feldgradient und die negativ geladenen DNA-Moleküle werden angezogen.

5

Letzterer Prozess wird im Wesentlichen durch Figur 7 verdeutlicht. Insbesondere ist hier ersichtlich, dass das in Lösung gebrachte Kupfer-Ion komplexiert wird, wozu Histidin-Moleküle 70 verwendet werden.

10

Aus der Figur 1 sowie den Teilfiguren 6a und 6b ist ersichtlich, dass durch Anlegen spezifischer Potenziale an die Messelektroden 20, 30 und Hilfselektroden 40, 45 eine gewünschte Selektion der DNA erreicht wird. Im Einzelnen werden die
15 Messelektroden negativ, die Hilfselektroden positiv polarisiert. Sofern sich die gesamte Anordnung in einer wässrigen Lösung befindet, die Kupfer(II)-Ionen (Cu^{2+}) enthält, werden diese auf den Messelektroden 20, 30 zu metallischem Kupfer (Cu^0) reduziert. Dadurch entsteht ein Feldgradient und die
20 negativ geladene, nicht vollständig komplementäre DNA wird abgestoßen.

Beide Alternativen können separat oder aber kombiniert ablaufen. Zunächst werden Zielmoleküle angereichert und dann selektiert. Es kann aber auch nur eine Selektion vorgenommen
25 werden.

In den Figuren 2 bis 4 sind unterschiedliche Varianten von Sensoranordnungen dargestellt. In Figur 2 haben die aus Gold gebildeten Messelektroden 20, 30 freie Gold-Sensorflächen 21, 31, an die die Fänger-DNA 100 gebunden sind. Alternativ ist
30 in Figur 3 ein Hydrogel 35 vorhanden, welches Fänger-DNA 100 enthält. Speziell in Figur 4 ist eine Anordnung dargestellt, bei der neben den eigentlichen Messelektroden 20 und 30 weiterhin eine freie Reaktionsfläche 50 aus Gold vorhanden ist,
35 an welcher die Fänger-DNA 100 in einer dichten Anordnung gebunden sind. Dies hat den Vorteil einer großen Dichte von

Fänger-DNA. Allerdings müssen bei der Herstellung der Reaktionsfläche 50 zunächst die Messelektroden 20, 30 durch Kupfer oder dergleichen abgedeckt werden,, um dort eine Anlagerung der Fänger-DNA 100 zu verhindern. In Figur 4 sind dafür Kupfer-Schichten 22 bzw. 32 vorhanden. Bei allen Anordnungen gemäß den Figuren 2 bis 4 ist jeweils die Opferelektrode 40 in der Nähe der Messelektroden 20 und 30 angeordnet, um durch das Inlösunggehen von Kupfer den Feldgradienten aufzubauen und damit die Anreicherung der Ziel-DNA 200 in der Nähe der Messelektroden 20 und 30 zu bewirken. Im Ergebnis kann somit die Messgenauigkeit erheblich verbessert werden.

In den Figuren 8 bis 10 sind die verschiedenen Varianten von Messsensoren gemäß den Figuren 2 bis 4 in der Draufsicht dargestellt. Speziell in Figur 8 ist ein Messsensor 80 vorhanden, der aus zwei Kammelektroden 82 und 83 mit ineinander greifenden Elektrodenfingern besteht, wobei eine einzige Opferelektrode 84 ringartig um die Kammelektroden angeordnet sind.

Entsprechendes ergibt sich aus Figur 9, wobei hier der Bereich der Kammelektroden mit der Hydrogelschicht 85 abgedeckt ist. Eine derartige Hydrogelschicht kann sich über der gesamten Messanordnung befinden. Speziell in Figur 10 sind zusätzlich noch Reaktionsflächen 86 zum Anlagern von Fängermolekülen vorhanden.

Aus den Einzelsensoren gemäß den Figuren 8 bis 10 können Arrays konzipiert werden, die n-Zeilen und m-Spalten haben. Aus den Figuren 11 und 12 ist eine Komplettanordnung mit einer Vielzahl von Messsensoren 80, 80',... die das n-m-Array darstellen. Dabei ist es prinzipiell möglich, das Array mit Einzelpositionen entsprechend einer der Figuren 8 bis 10 aufzubauen, bei der jede Einzelposition eine ringartige Kupfer-Opferanode 84 hat. Um die gesamte m-n-Anordnung mit den Einzelpositionen ist dabei als weiterer Ring die Hilfselektrode 185 angeordnet.

Gemäß Figur 11 befindet sich die Komplettanordnung 180 in einem Behälter, z.B. einem Durchflusskanal 150, mit einem Deckel 120, einem Zufluss 121 und einem Abfluss 122.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Transport elektrisch geladener Moleküle in einer wässrigen Lösung, insbesondere beim Betrieb eines DNA-Sensors mit einem Redox-Cycling-Prozess zwischen zwei Messelektroden, g e k e n n z e i c h n e t durch folgende Maßnahmen:
- in der Nähe der Messelektroden wird ein metallisches Material, das im wässrigen Elektrolyten beständig und unedler als das der Messelektrode ist, als potenzialbeaufschlagbare Elektrode angeordnet,
 - durch Anlegen eines positiven Potentials an die Elektrode wird das metallische Material als positiv Ionen in Lösung gebracht,
 - wodurch negativ geladene Moleküle als Zielmoleküle in die entgegengesetzte Richtung transportiert und an den Messelektroden angereichert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass die in Lösung gehende Metallionen durch die Anwesenheit eines Komplexbildners komplexiert werden, wodurch ihre Konzentration gering und nahezu konstant gehalten wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass als metallisches Material Kupfer verwendet wird, welches eine Kupfer-Opfer-Anode bildet.
4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass als Komplexbildner zur Komplexierung des Kupfer-Ions Histidin verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, d a d u r c h k e n n z e i c h n e t , dass zum Detektieren der Zielmoleküle Fängermoleküle an einer Elektrodenoberfläche verwendet werden.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Fängermoleküle thiolmodifizierte Fängermoleküle verwendet werden.

5

7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass als Fängermoleküle hydrogelgebundene Fängermoleküle verwendet werden.

10 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass ein Elektrophoreseverfahren ausgeführt wird.

15 9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine DNA-Analyse von DNA-Fragmenten erfolgt.

20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass bei der DNA-Analyse die angereicherten Moleküle als Zielmoleküle detektiert werden.

25 11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass durch Polarisierung der für die Elektrophorese bzw. DNA-Analyse verwendeten Elektroden die Selektivität des Prozesses erhöht wird.

30 12. Verfahren zur bindungsspezifischen Trennung elektrisch geladener Moleküle in einer wässrigen Lösung, insbesondere beim Betrieb eines DNA-Sensors mit einem Redox-Cycling-Prozess zwischen zwei Messelektroden, gekennzeichnet durch folgende Maßnahmen:

- in der wässrigen Lösung befinden sich Metallionen
- durch Anlegen eines negativen Potentials an die Messelektroden wird das Metallion an den Messelektroden als Metall abgeschieden,
- 35 - wodurch negativ geladene, in der Nähe der Messelektroden gebundene Moleküle als Zielmoleküle mit einer hinreichend

niedrigen Bindungsenergie von den Messelektroden wegtransportiert werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, d a d u r c h g e -

5 k e n n z e i c h n e t , dass als Metallionen Kupfer und als Messelektroden Gold verwendet werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12, d a d u r c h g e -

10 k e n n z e i c h n e t , dass die von den Messelektroden wegtransportierten Moleküle solche Zielmoleküle sind, die bei der DNA-Analyse nicht detektiert werden sollen.

15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder einem der Ansprüche 2 bis 10 bzw. zur Durchführung des

15 Verfahrens nach Anspruch 12 oder einem der Ansprüche 13, 14, mit einer Anordnung aus Mess-Elektroden (20, 30) zur elektrochemischen Messung in einer wässrigen Lösung (15), wobei in der wässrigen Lösung Metallionen bzw. Häufungen (40) von Metall aus unedlerem Material als das der Messelektroden (20, 30), wobei das Material in wässriger Lösung (15) beständig ist, vorhanden sind.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, d a d u r c h g e -

25 k e n n z e i c h n e t , dass die Messelektroden (20, 30) aus Edelmetall, insbesondere Gold, bestehen.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15, d a d u r c h g e -

30 k e n n z e i c h n e t , dass das Metall Kupfer ist und eine Opferelektrode (40) bildet.

18. Vorrichtung nach Anspruch 16, d a d u r c h g e -

35 k e n n z e i c h n e t , dass die Messelektroden aus Gold eine Sensoroberfläche (21, 31) aufweisen, an der Fängermoleküle für die Ziel-DNA (200) gebunden sind.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15, 16 oder 18

d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass die

15

Messelektroden (20, 30) eine Interdigitalstruktur aus Kamm-
elektroden (82, 83) mit ineinander greifenden Elektrodenfin-
gern bilden.

5 20. Vorrichtung nach Anspruch 17, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass die Opferelektrode (84)
ringartig um die Kammelektroden (82, 83) angeordnet ist.

10 21. Vorrichtung nach Anspruch 15, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass auf den Messelektroden (20,
30) eine Hydrogelschicht (35) zum Binden der Fängermoleküle
(100) angeordnet ist.

15 22. Vorrichtung nach Anspruch 15, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass den Messelektroden (20, 30)
separate Reaktionsflächen (50) zum Anlagern der Fängermolekü-
le (100) zugeordnet ist.

20 23. Vorrichtung nach Anspruch 19, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass von einzelnen Interdigital-
strukturen (80, 80', ...) mit Opferelektrode (84) ein Array
(80) mit m Zeilen und n Spalten gebildet ist.

25 24. Vorrichtung nach Anspruch 23, d a d u r c h g e -
k e n n z e i c h n e t , dass eine Hilfselektrode (185) zu
den einzelnen Operelektroden (84) ringartig um das m-n-Array
(180) verläuft.

1/5

FIG 1

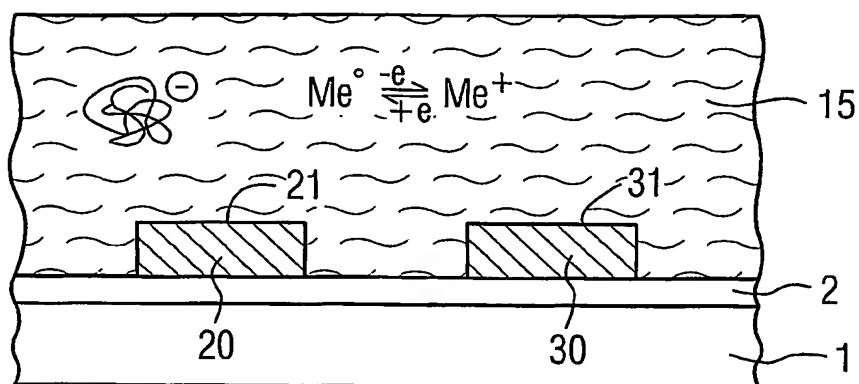


FIG 2

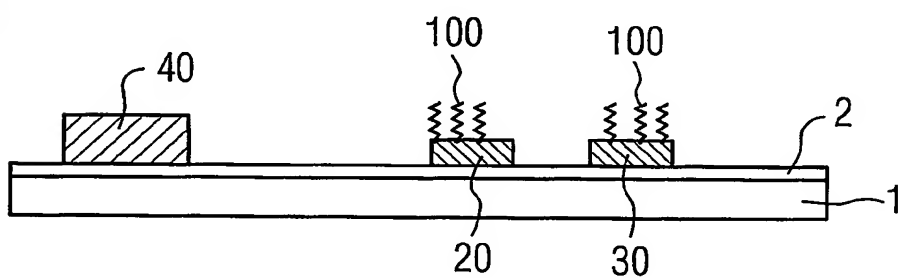


FIG 3

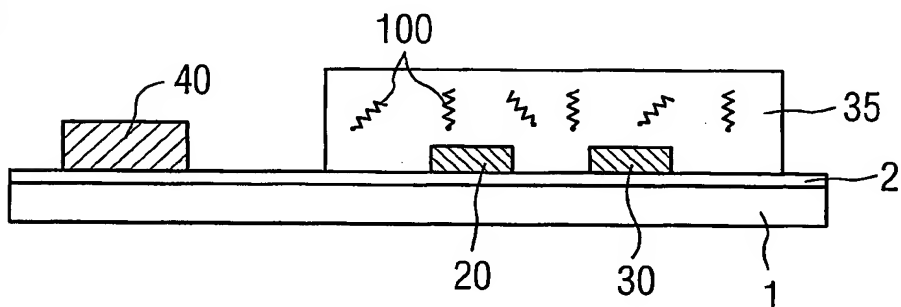


FIG 4

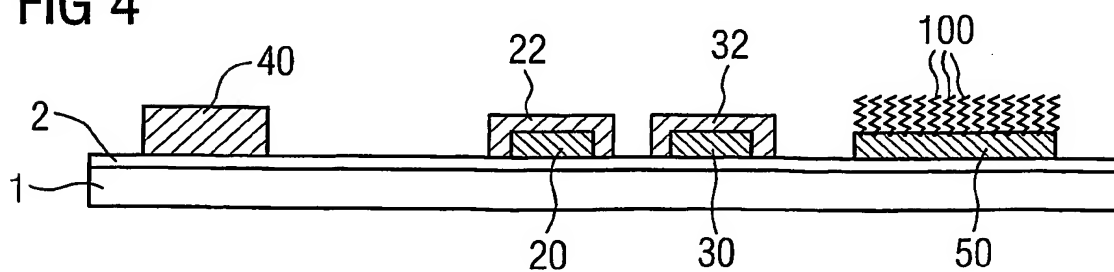


FIG 5

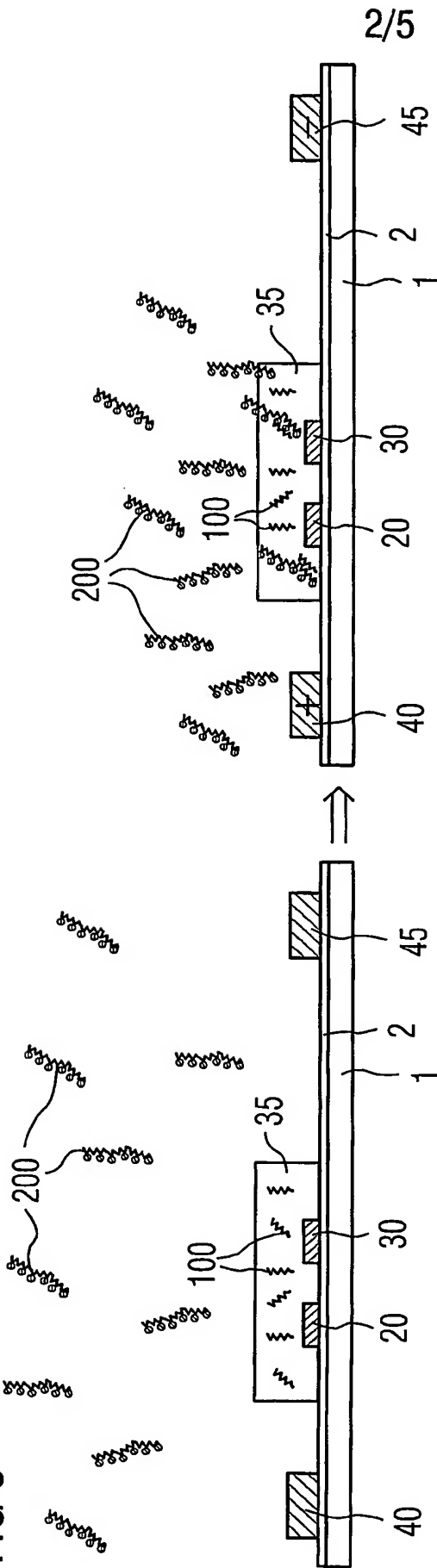
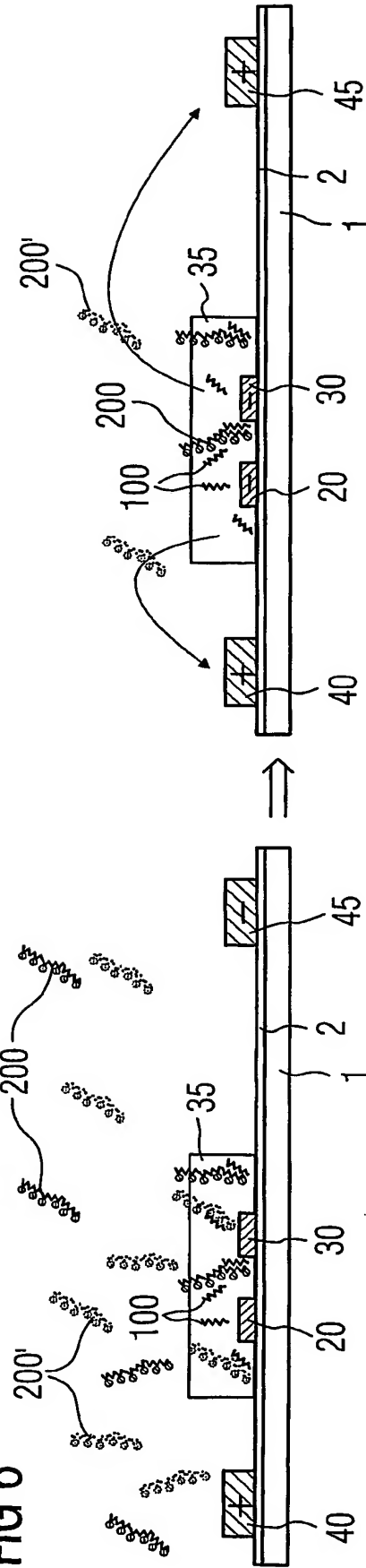


FIG 6



3/5

FIG 7

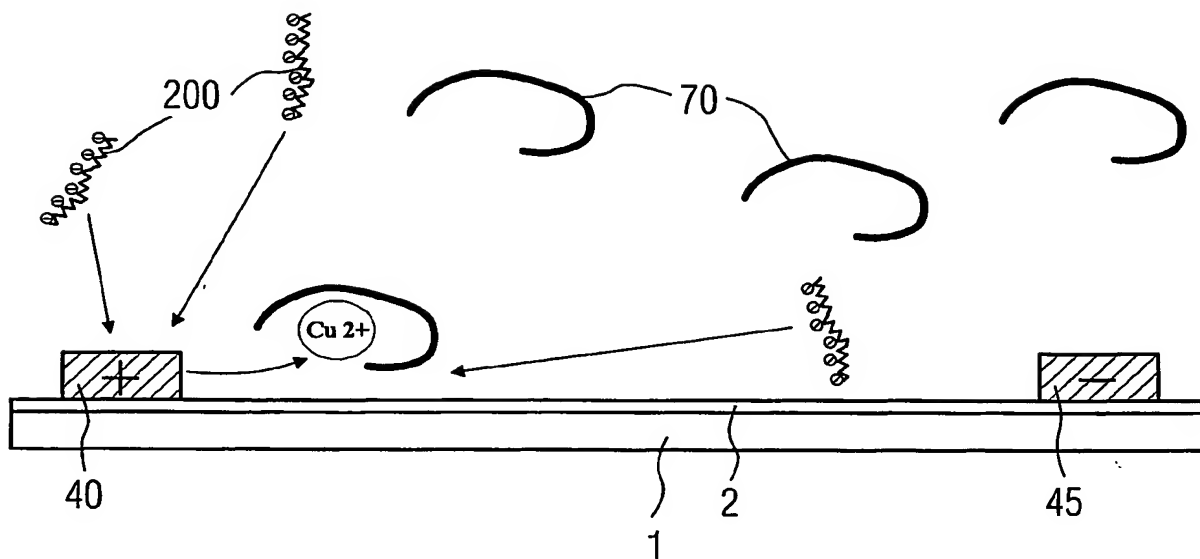


FIG 8

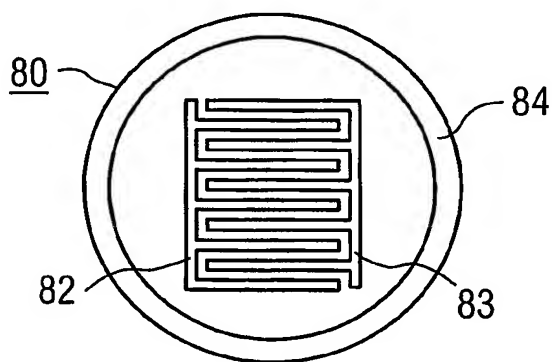
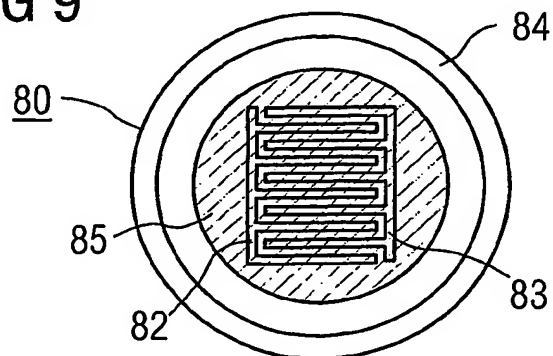


FIG 9



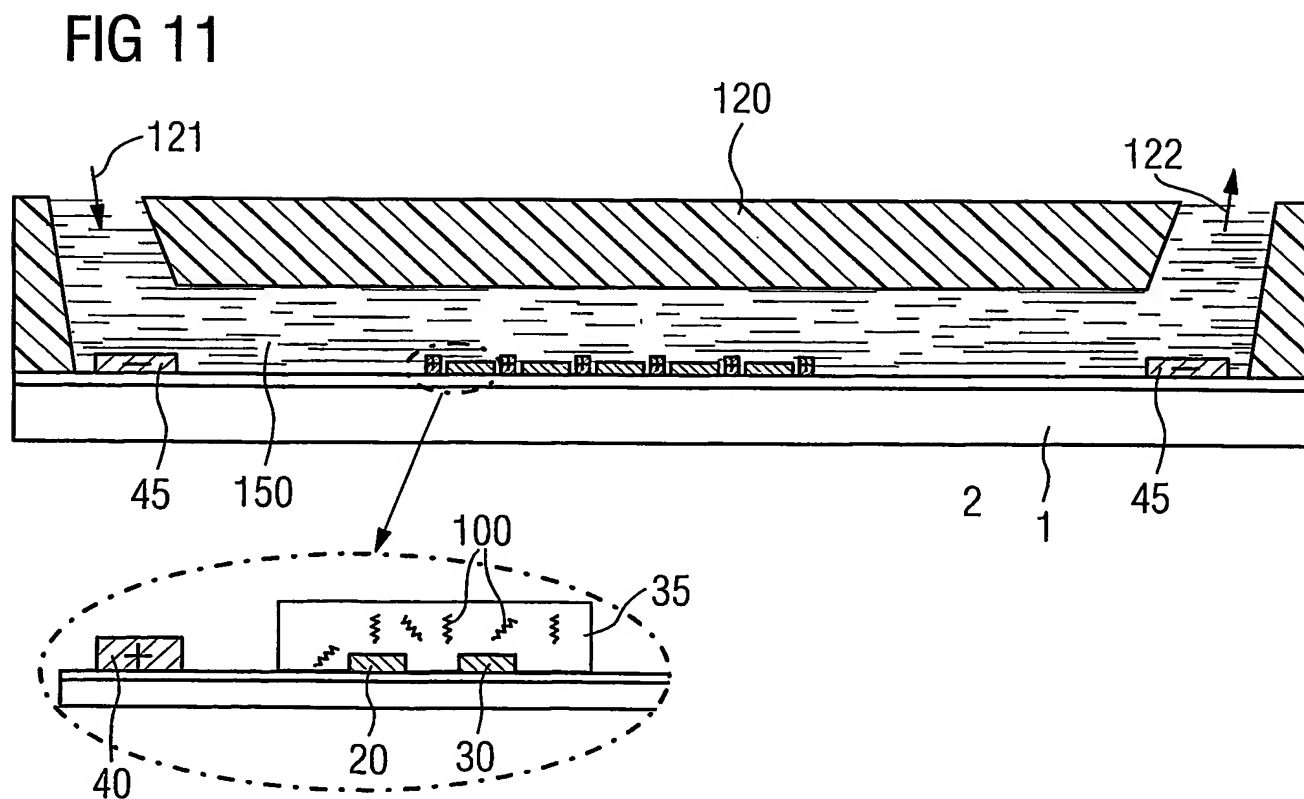
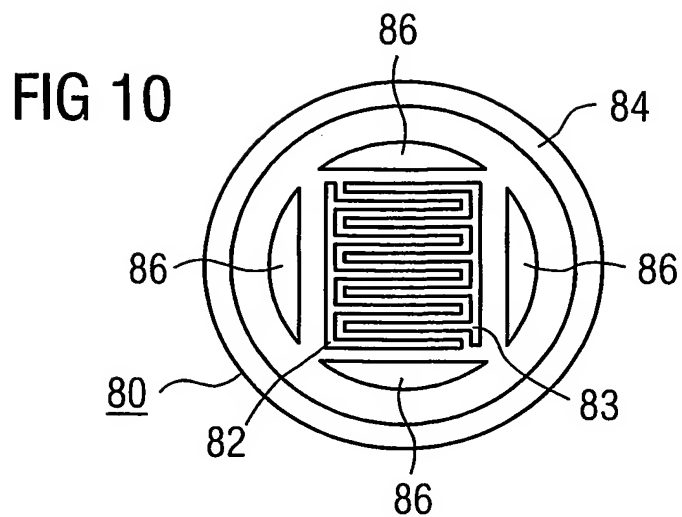
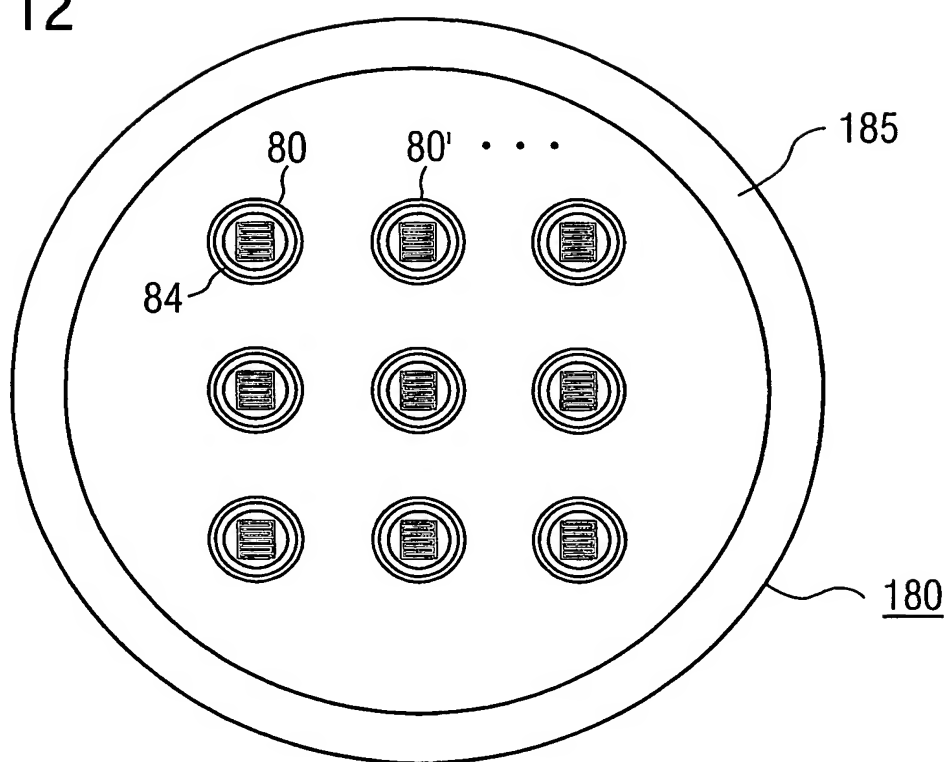


FIG 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 03/03938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/063041 A (MITOCON LTD) 15 August 2002 (2002-08-15) the whole document -----	1, 12

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April 2004

Date of mailing of the international search report

03/05/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 03/03938

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 02063041	A	15-08-2002	KR	2002065241 A	13-08-2002
			WO	02063041 A1	15-08-2002
			US	2003039975 A1	27-02-2003
<hr/>					

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03938

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/543 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 02/063041 A (MITOCON LTD) 15. August 2002 (2002-08-15) das ganze Dokument	1, 12

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. April 2004

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

03/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Moreno, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die derselben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 03/03938

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 02063041 A	15-08-2002	KR 2002065241 A	13-08-2002
		WO 02063041 A1	15-08-2002
		US 2003039975 A1	27-02-2003
<hr/>			

GERMAN TRANSLATION AID

Es bedeutet: (It means:)

- X: Druckschriften, die Neuheit oder Erfindungshöhe allein in Frage stellen
(Publications, which question novelty or just obviousness)
- Y: Druckschriften, die die Erfindungshöhe zusammen mit anderen Druckschriften in Frage stellen
(Publications which, together with other publications, question obviousness)
- A: Allgemein zum Stand der Technik, technologischer Hintergrund
(General state of the art, technological background)
- O: Nicht-schriftliche Offenbarung, z. B. ein in einer nachveröffentlichten Druckschrift abgedruckter Vortrag, der vor dem Anmelde- oder Prioritätstag öffentlich gehalten wurde
(Non-written disclosure, for example, a printed post publication of a lecture which was publicly made before the filing date or priority date)
- P: Im Prioritätsintervall veröffentlichte Druckschriften
(Publications publicized in a priority interval)
- T: Nachveröffentlichte, nicht kollidierende Druckschriften, die die Theorie der angemeldeten Erfindung betreffen und für ein besseres Verständnis der angemeldeten Erfindung nützlich sein können bzw. zeigen daß der angemeldeten Erfindung zugrunde liegende Gedankengänge oder Sachverhalte falsch sein könnten
(Post publications, not anticipating publications, which refer to the theory of the filed invention and which refer could be useful for a better understanding or, as the case may be, which could show that reasoning or facts of the filed invention are incorrect)
- E: Ältere Anmeldungen gemäß §3 Abs.2 PatG (bei Recherchen nach § 43 PatG); ältere Patentanmeldungen oder ältere Gebrauchsmuster gemäß § 15 GbmG (bei Recherchen nach § 7 GbmG)

(Older applications under § 3 section 2 PatG (inquiries under § 43 PatG); older patent applications or patents under § 15 GbmG (inquiries under § 7 GbmG))

D: Druckschriften, die bereits in der Patentmeldung genannt sind

(Publications, which are cited in the patent application)

L: Aus besonderen Gründen genannte Druckschriften, z. B. zum Veröffentlichungstag einer Entgegenhaltung oder bei Zweifeln an der Priorität.

(Publications which are cited for a particular reason, for example, relative to the publication date of a reference or cast doubt on the priority)

Veröff: Veröffentlichungstag einer Druckschrift im Prioritätsintervall

(Publication date of a publication in a priority interval)

nr: Nicht recherchiert, da allgemein bekannter Stand der Technik, oder nicht recherchierbar

(Not searched, because it is known state of the art, or cannot be searched)

=: Druckschriften, die auf dieselbe Ursprungsanmeldung zurückgehen ("Patentfamilien"), oder auf die sich Referate oder Abstracts beziehen.

(Publications, which refer to the same original application ("patent family"), or which are referred to in reviews or abstracts.)

“-“: Nichts ermittelt

(Nothing discovered)

Hier sind die Ansprüche unter Zuordnung zu den in Spalte 2 genannten relevanten Stellen angegeben.

(The claims are stated herein which refer to the relevant positions recited in column 2.)

Seite (page)

Zeile (line)

Abbildungen (Drawings)

Spalte (Column)

Absatz (Paragraph)

Zusammenfassung (Abstract of Disclosure)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
15 August 2002 (15.08.2002)

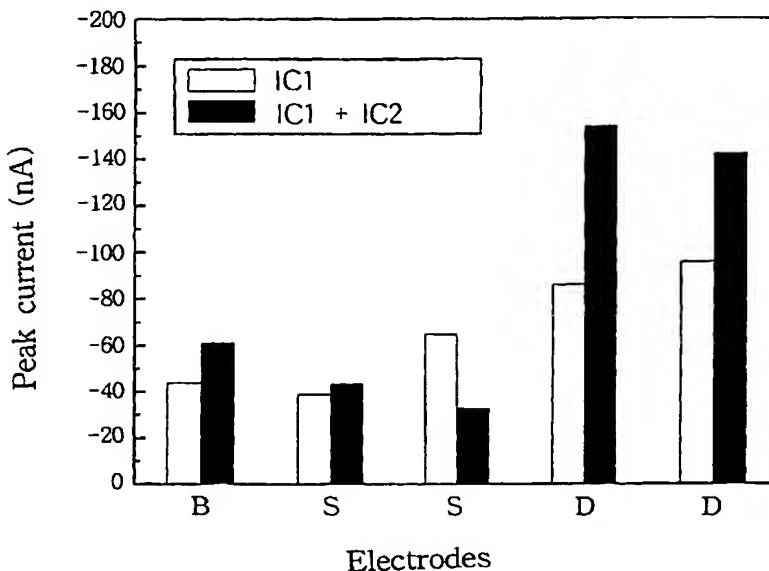
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/063041 A1

- (51) International Patent Classification⁷: **C12Q 1/68** (74) Agents: JANG, Seong Ku et al.; First Law Offices of Korea, KEC Building, 17th Floor 275-7, Yangjae-dong, Seocho-ku, Seoul 137-130 (KR).
- (21) International Application Number: PCT/KR01/01320
- (22) International Filing Date: 3 August 2001 (03.08.2001) (81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 2001/5667 6 February 2001 (06.02.2001) KR
- (71) Applicant: MITOCON LTD. [KR/KR]; Namhyung Building #746-23 4th Floor,, Yeoksam-dong, Kangnam-gu, Seoul 135-080 (KR).
- (72) Inventors: PAK, Youngmi, Kim; Samsung Jangmi Apt., 1141-801, Sanbon-dong, Kunpo-si, Kyungki-do 435-040 (KR). PAK, James Jungho; Samsung Jangmi Apt., 1141-801, Sanbon-dong, Kunpo-si, Kyungki-do 435-040 (KR). KIM, Sanghee; Sinbanpo2jigu Apt. 111-210 #73, Jamwon-dong, Seocho-gu, Seoul 137-030 (KR). LEE, Hong-Kyu; Bando Apt. 2-211, #301-170, Ichon-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-030 (KR).
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

[Continued on next page]

(54) Title: MIXED INTERCALATOR AND ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DNA USING SAME



(57) Abstract: Described in the present invention are a highly sensitive method for electrochemically detecting a DNA using a novel mixed intercalator and a detection kit useful for practicing said method.



WO 02/063041 A1

WO 02/063041 A1



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

MIXED INTERCALATOR AND ELECTROCHEMICAL DETECTION OF DNA USING SAME

FIELD OF THE INVENTION

5

The present invention relates to a highly sensitive method for electrochemically detecting a DNA using a unique combination of compounds as a mixed intercalator and a detection kit using same.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

DNA chips have been widely used in gene and molecular biology researches such as the measurement of RNA expression in a large scale, detection of mutant genome DNAs, gene diagnosis, pharmacogenomics and
15 medicine, as they can detect RNAs or DNAs contained in a sample much more efficiently than the conventional Southern blot or Northern blot method.

Generally, DNA chips detect a target DNA, for example, by way of accumulating hundreds of thousands of probe DNA fragments, each having a specified base sequence, on a very small chip surface, contacting the probe
20 DNA fragments with a single strand of the target DNA labeled with a fluorescent material to induce hybridization, and identifying the hybridized DNA by laser irradiation.

However, the above method has the disadvantages that it requires the use of an expensive optical apparatus including a laser scanner and the cost of
25 fluorescent labeling is high. Further, it is difficult to quantitatively determine the amount of the target DNA in a sample from the luminescent intensity.

Accordingly, there have been numerous efforts to solve the above-mentioned problems. For instance, Clinical Microsensors Inc. suggests a method of detecting a DNA by binding a redox-active material, e.g., a transition
30 metal complex, on a selected site of a single-stranded probe DNA, bringing a single-stranded target DNA into contact with the resulting probe DNA to induce hybridization, and measuring the change in the electron transporting rate attributable to the hybridization. In addition, Japanese Patent Publication No. 2000-125865 provides a method of detecting a gene of a specimen DNA by
35 allowing a single-stranded sample DNA to interact with a single strand probe DNA immobilized on an electrode surface in the presence of an electrochemically active intercalator to form a hybridized DNA carrying the

intercalator, followed by determining the current which flows through the intercalator.

These methods, however, still exhibit a limited sensitivity for quantitative DNA detection, and thus, there has existed a need to develop a DNA
5 detection method having a higher sensitivity.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, it is an object of the present invention to provide an
10 improved method for detecting a DNA with a high sensitivity.

It is another object of the present invention to provide a novel intercalator and a detection kit which are suitable for practicing the method.

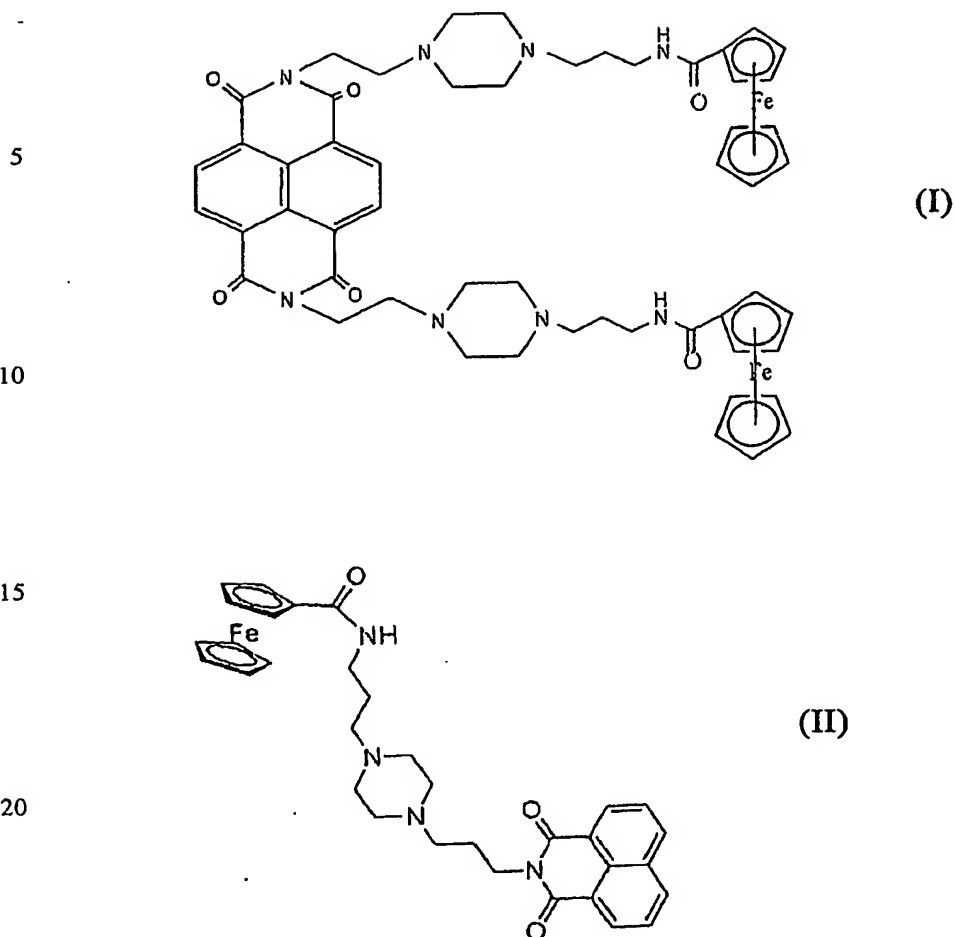
In accordance with one aspect of the present invention, there is provided a method for detecting a DNA having a specified base sequence
15 (target DNA); which comprises bringing a single strand of the target DNA (target ssDNA) into contact with a single strand probe DNA (probe ssDNA) bonded on the surface of an electrode equipped with an output terminal to form a double strand DNA (dsDNA), adding a mixed intercalator consisting of compounds of formulae (I) and (II) to intercalate the dsDNA therewith, and
20 determining the current generated when a voltage is applied to the electrode.

In accordance with another aspect of the present invention, there is provided an alternative method for detecting a DNA having a specified base sequence (target DNA), which comprises bringing a single strand of the target DNA (target ssDNA) into contact with a single strand probe DNA (probe
25 ssDNA) bonded on the surface of an electrode equipped with an output terminal in the presence of a mixed intercalator consisting of compounds of formulae (I) and (II) to obtain a double strand DNA intercalated by said compounds, and determining the current generated when a voltage is applied to the electrode:

30

35

3



25 In accordance with still another aspect of the present invention, there is provided a DNA detection kit used in practicing the method, comprising a DNA sensor having a layer of single strand probe DNAs bonded on the surface of an electrode equipped with an output terminal and a mixed intercalator consisting of compounds of formulae (I) and (II); and the mixed intercalator.

30

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

35 The above and other objects and features of the present invention will become apparent from the following description of the invention, when taken in conjunction with the accompanying drawings, which respectively show:

FIG. 1 : a schematic procedure for the preparation of a dsDNA - electrode in accordance with one embodiment of the present invention;

FIG. 2 : a schematic representation of the electron transfer through a layer of an intercalator and the typical cyclic current - voltage curve obtained therefor; and

FIG. 3 : peak current values obtained with a conventional single intercalator and the inventive mixed intercalator.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The probe ssDNA used in the present invention may be obtained from a DNA isolated from a biological sample or chemically synthesized.

A probe ssDNA - electrode which comprises an electrode having an output terminal and a probe ssDNA bonded to one surface thereof is prepared, e.g., by reacting the bare electrode surface with a compound having a terminal -SH group and a functional group such as -OH, -COOH and -NH₃ at the other end, e.g., 2-mercaptoethanol, 3-mercaptopropanol and 3-mercaptopropionic acid, to obtain a coated electrode which has a monolayer of the compound bonded to the electrode through sulfide bonds, and then, reacting an ssDNA having a phosphoric acid group at its 5'-end with the coated electrode, wherein the phosphoric acid group bonds with the functional group such as -OH, -COOH and -NH₃ exposed on the coated electrode. This reaction may be performed in a buffer solution of pH 4.5 to 6.4 in the presence of an acid catalyst such as 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and the resulting electrode is designated "ssDNA - electrode". Alternatively, an ssDNA having a -SH group instead of a phosphoric acid group at its 5'-end may be immobilized directly to the surface of a bare electrode, followed by filling the open surface of the resulting electrode with, e.g., 2-mercaptoethanol.

The ssDNA-electrode thus prepared is treated with a solution containing a single strand target DNA at room temperature for a period ranging from 12 to 48 hours, preferably 24 hours, inducing hybridization between the probe DNA and the target DNA to form a dsDNA and the electrode having such a dsDNA is designated "dsDNA - electrode".

During or after the process of forming the dsDNA, a mixed intercalator of the present invention, consisting of N,N-bis[[4-(3-ferrocenecarboxamidopropyl)piperazinyl]propyl]naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic acid of formula (I), designated IC1, and N-[[4-(3-ferrocenecarboxamidopropyl)piperazinyl]propyl]-1,8-naphthalene imide of formula (II), designated IC2, is allowed to be intercalated and incorporated in

the formed dsDNA. The inventive mixed intercalator is capable of forming a stable intercalation complex with the dsDNA, while it does not form stable adducts with ssDNAs.

Consequently, in case the DNA present in a sample is capable of hybridizing with the probe DNA, the inventive mixed intercalator which contains the ferrocene moieties of IC1 and IC2 having desirable redox properties work together to facilitate the electron transfer process when a potential is applied to the dsDNA – electrode.

It is understood that IC1 intercalates selectively into a site which is separated by 3 to 5 pairs of bases from the next site, while the insertion of one molecule of IC2 requires only one pair of base. But, the use of IC2 alone does not provide an intercalated dsDNA having desirable properties. When a combination of IC1 and IC2 is used in a weight ratio of 1:0.1~10, preferably 1:0.5~5, IC2 is inserted into sites which are not occupied by IC1 and they work together to create a synergistic effect of enhancing the electron transport process through the dsDNA chain. IC2 further acts as a supersensitizer for the reduction of oxidized IC1.

Based on the method of the present invention, it is possible to identify a target DNA in a sample by way of using a DNA detection kit comprising a DNA sensor and the inventive mixed intercalator, the sensor containing a single strand probe DNA which is hybridizable with the target DNA and immobilized on an electrode equipped with an output terminal. Such a sensor may contain a plurality of electrodes coated with various probe ssDNAs for detecting a multiple number of DNAs in a sample. As the current density obtained as a result of the present invention depends on the concentration of the target ssDNA in the sample, it is possible to quantify the amount thereof.

The current density may be measured by any method, e.g., cyclic voltametry, differential pulse voltametry and potentiostat.

As described above, the method of the present invention provides a simple and sensitive means for assessing the identity and the amount of a target DNA in a sample.

The following Examples are given for the purpose of illustration only, and are not intended to limit the scope of the invention.

Example 1 : Preparation of a probe ssDNA - electrode

(Step 1) Coating of Au electrode

An Au electrode with an area of 2 mm^2 (MF-2014 AUE gold electrode, BAS, IN, USA) was sequentially washed with hot 2 M NaOH for 5 min., and then, with concentrated nitric acid for 5 min., followed by two cycles of ultrasonic-treatment in distilled water, each for 3 min. The electrode was
5 dipped in an aqueous 0.1 M sulfuric acid solution, and the voltage applied thereto was cycled between 0 to 1.5 V at a rate of 100 mV/s using a voltammetric analyzer (BAS, CV-50W, IN, USA), until the current originating from contaminants was no longer detectable, to determine a basal line. The bare electrode thus obtained was treated with a 1 mM 2-mercaptoethanol (2-
10 ME) solution for 2 hr to induce sulfide bond formation between the -SH group of 2-mercaptoethanol and the electrode surface. The resulting electrode was coated with a monolayer of covalently bonded -S-CH₂CH₂-OH, the terminal -OH group being extended outwards.

15 (Step 2) Preparation of ssDNA - electrode

Using an oligonucleotide synthesizer, sense and anti-sense oligonucleotides of sequence numbers: 1 and 2 were prepared, and then, a phosphoric acid group was joined to the 5'-end of the sense oligonucleotide. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydro-chloride (EDAC) and
20 the sense oligonucleotide (ssDNA) were dissolved to concentrations of $1 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ and 1 mM, respectively, in a 40 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer solution (pH 4.5), and the coated electrode prepared in (Step 1) was treated with the solution for 24 hrs to obtain a ssDNA - electrode having the phosphoric acid groups of the ssDNA bonded with the -OH groups of the
25 electrode surface.

Example 2 : Detection of DNA

(Step 1) Formation of hybrid DNA

30 $1 \text{ } \mu\text{l}$ of anti-sense DNA (asDNA) ($1 \text{ nmol}/\mu\text{l}$) of sequence number: 2 was added to $30 \text{ } \mu\text{l}$ of a hybridizing solution ($0.09 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ of salmon spermatozoon DNA, $0.5 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$ of acetylated cow serum albumin, 27 mM MES (free acid), 74 mM MES (sodium salt), 0.89 M NaCl, 0.01% Tween 20 and 20 mM EDTA), and the ssDNA - electrode prepared in Example 1 was reacted
35 with the solution at 37°C for 24 hrs. to form a hybrid DNA. The resulting electrode was washed with a washing solution (27 mM MES (free acid), 74 mM MES (sodium salt), 26 mM NaCl and 0.01% Tween 20) at 37°C for 15 min.

and the washing procedure was repeated three-times to obtain a dsDNA – electrode which has double-stranded DNAs attached to the electrode. The preparative procedure of such a dsDNA – electrode is schematically showed in FIG 1.

5

(Step 2) Combination of dsDNA and intercalator

N,N-bis[[4-(3-ferrocenecarboxamidopropyl)piperazinyl]propyl]-naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic acid of formula (I) (IC1) and N-[[4-(3-ferrocenecarboxamidopropyl)piperazinyl]propyl]-1,8-naphthalene imide of
10 formula (II) (IC2) were dissolved in distilled water, each to the concentration of 40 μ M, and the dsDNA – electrode prepared in (Step 1) was treated with the solution at room temperature for 10 min. to obtain a dsDNA – electrode wherein both IC1 and IC2 were incorporated in the dsDNA as intercalators. For comparison, another dsDNA – electrode intercalated only by IC1 was
15 prepared by a similar method.

A voltage was applied to a tri-electrode system which comprises one of the prepared dsDNA – electrodes as a working electrode, Ag/AgCl as a reference electrode and Pt wire as a counter electrode, and the current generated by the applied voltage-induced redox reactions in the electrolyte solution (0.1 M
20 KCl) was measured with a voltammetric analyzer (BAS, CV-50W, UK). In this case, the current is transferred to the electrode via IC1 and IC2, or via IC1 alone, and the amount of the current was obtained from the cyclic voltammetry (see FIG. 2).

As shown in FIG. 3, the peak current obtained for the system containing
25 the conventional intercalator, i.e., IC1 alone, was not nearly as high as the currents obtained for two cases of the inventive mixed intercalator (IC1 and IC2). In this figure, B refers to the basal line mentioned in (Step 1) of Example 1; S, an ssDNA – electrode; and D, a dsDNA – electrode (two independent cases). The markedly high current density obtained for the
30 inventive dsDNA – electrode may be attributed to the ability of IC2 to occupy sites that are inaccessible by IC1.

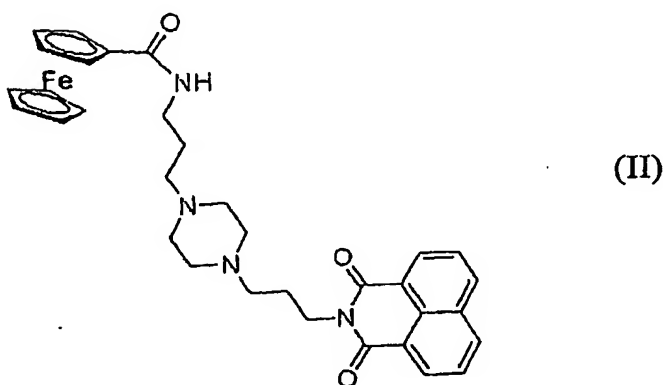
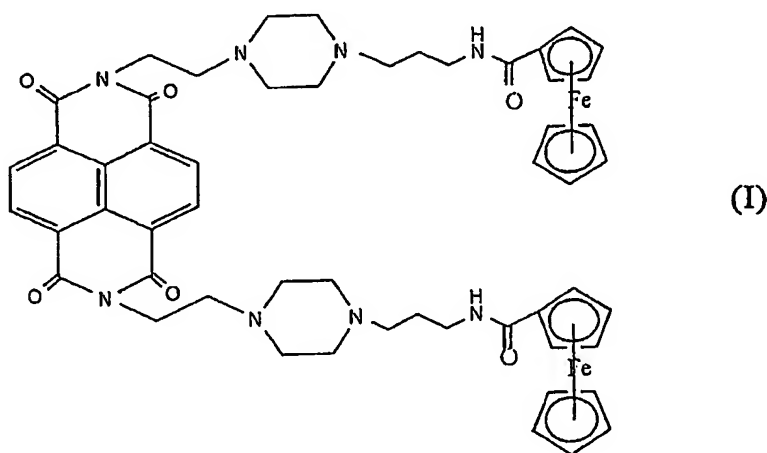
As described above, in accordance with the method of the present invention, an unknown DNA can be assayed quantitatively with a high
35 sensitivity.

While the embodiments of the subject invention have been described and illustrated, it is obvious that various changes and modifications can be

made therein without departing from the spirit of the present invention which should be limited only by the scope of the appended claims.

WHAT IS CLAIMED IS :

1. A method for detecting a DNA having a specified base sequence (target DNA), which comprises bringing a single strand of the target DNA (target ssDNA) into contact with a single strand probe DNA (probe ssDNA) bonded on the surface of an electrode equipped with an output terminal to form a double strand DNA (dsDNA), adding a mixed intercalator consisting of compounds of formulae (I) and (II) to intercalate the dsDNA therewith, and determining the current generated when a voltage is applied to the electrode:



2. A method for detecting a DNA having a specified base sequence (target DNA), which comprises bringing a single strand of the target DNA (target ssDNA) into contact with a single strand probe DNA (probe ssDNA) bonded on the surface of an electrode equipped with an output terminal in the presence of a

mixed intercalator consisting of compounds of formulae (I) and (II) to obtain a double strand DNA intercalated by said compounds, and determining the current generated when a voltage is applied to the electrode.

- 5 3. A DNA detection kit used in practicing the method of claim 1 or 2, comprising a DNA sensor having a layer of single strand probe DNAs bonded on the surface of an electrode equipped with an output terminal and a mixed intercalator consisting of compounds of formulae (I) and (II).
- 10 4. A mixed intercalator which consists of compounds of formulae (I) and (II).

1/2

FIG. 1

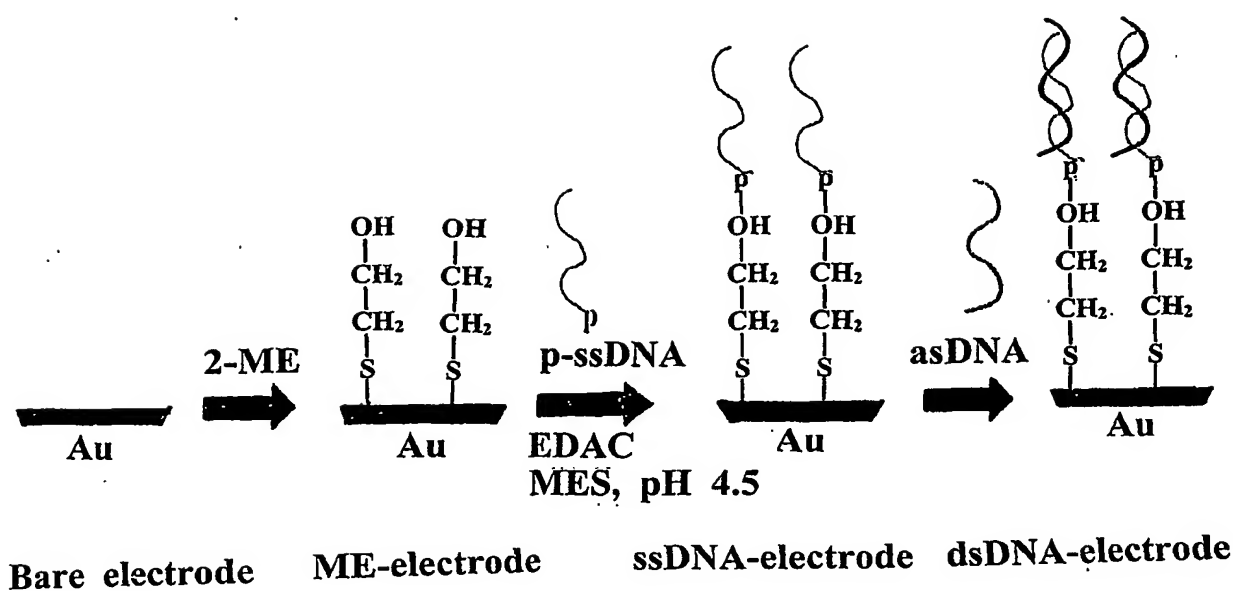
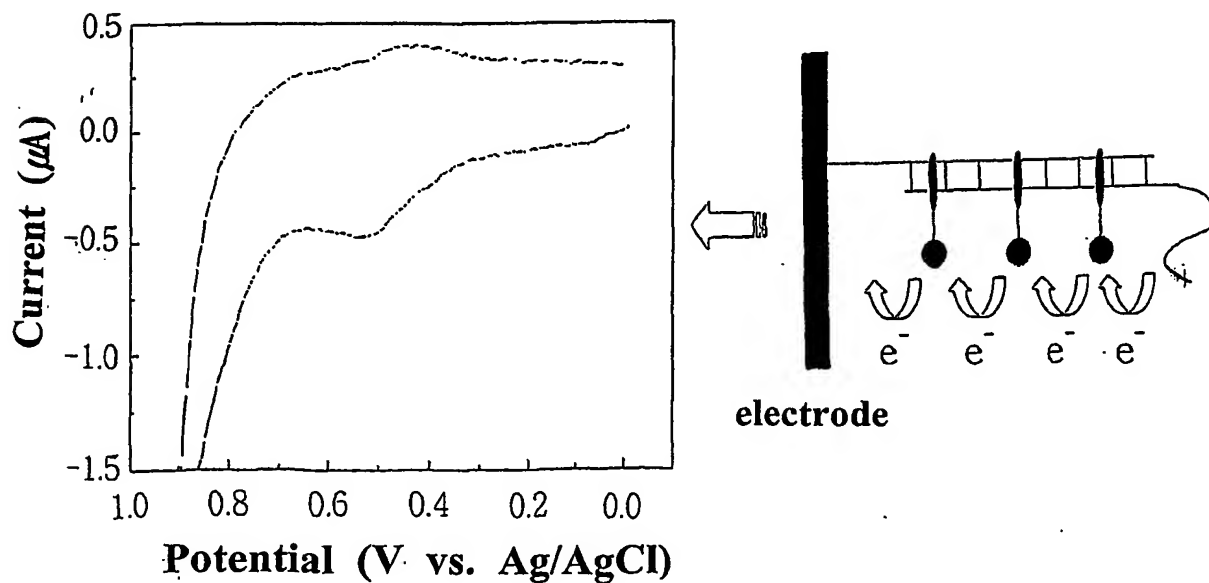
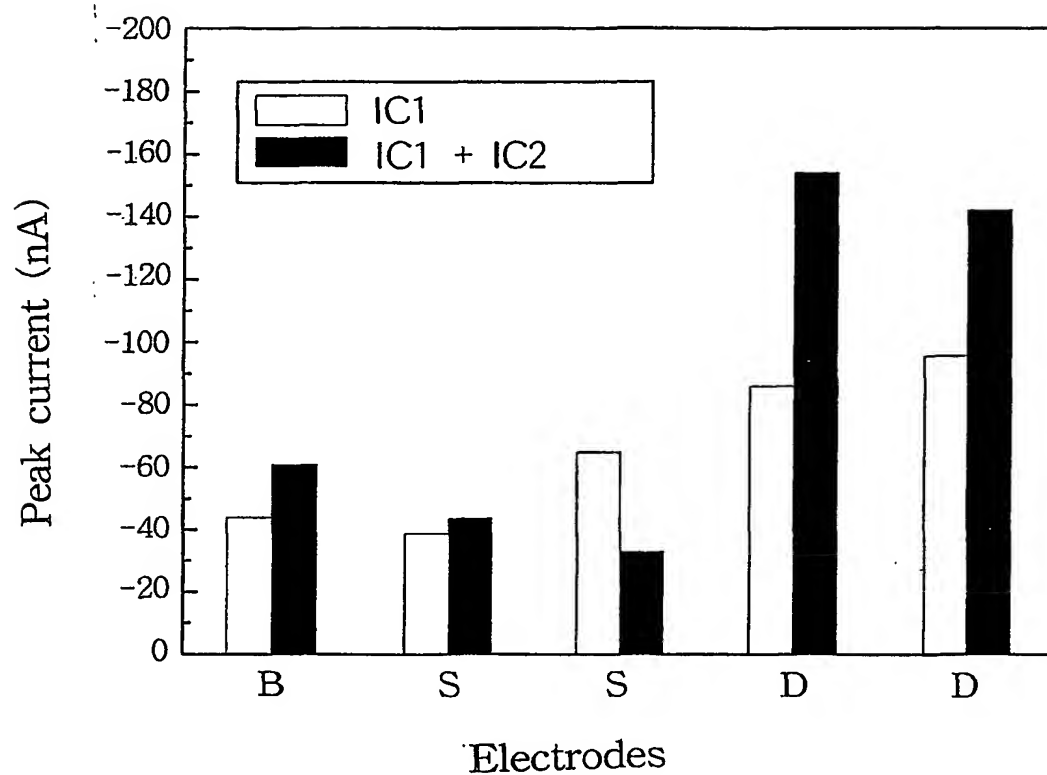


FIG. 2



2/2

FIG. 3



Sequence Listing

<110> Mitocon, Ltd.

<120> Mixed intercalator and electrochemical detection of DNA using same

<130> mtc-0681

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic sense oligonucleotide

<400> 1

cctaaccaga ttccaattt tatctttt

28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> antisense of SEQ ID NO: 1

<400> 2

aaaagataaa atttgaaatc tggtagg

28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR01/01320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC7 C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7 C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Patents and applications for inventions since 1975

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Registry file, CAPLUS, MARPAT, WPI, Medline "intercalat*" and DNA and ferrocen**

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takenaka 'DNA sensing on a DNA probe-modified electrode using ferrocenylnaphthalene diimide as the electrochemically active ligand' In: Anal. Chem., 2000, Vol.72, p1334-1341	1 - 4
A	Yamashita et. al 'Highly sensitive detection of target gene by electrochemical method' In: Nucleic Acids Symp Ser, 1999, p185-186	1 - 4
A	EP 1065278 A2 (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 03 JAN 2001	1 - 4
A	JP 2000-125865 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD) 09 MAY 2000 cited in the application	1 - 4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 DECEMBER 2001 (19.12.2001)

Date of mailing of the international search report

20 DECEMBER 2001 (20.12.2001)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon
Metropolitan City 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

HAN, Hyun Sook

Telephone No. 82-42-481-5596



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR01/01320

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1065278 A2	03.01.00	JP 200111672 A	27.04.01